

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.P.5.3 Reporte de validación para la determinación de Aminoácidos en tabletas recubiertas de Ketosteril por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Abreviaturas

LEF – Laboratorio de estudios farmacéuticos

Referencias

LEF estudio nro. PEI/2009/00190, Revisión 1: "Reporte de validación analítica: Metodología analítica de Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de aminoácidos en comprimidos de Ketosteril®"
P.6.00013_00_i: "Tabletas de Ketosteril 100/30"

Materiales y métodos

Equipamientos

Sistemas cromatográficos

Sistema 1 y 2

Módulo de separaciones Waters 2695 Alliance, Detector de red de fotodiodos Waters 2996, Columna Waters AccQ-Tag, 150mmx3.9mm, 4 µm.

Otros equipos

Balanza analítica Sartorius R200D, balanza digital Sartorius YDP03 OCE, balanza Mettler AB204-S, balanza digital Mettler RS-P42, balanza Mettler AE24OS, equipo de centrifugación Eppendorf 5702R, baño Ultrasónico Sonorex RK51OS, baño de agua GFL 1013, agitador magnético Viaromag Telesystem 15 HP, micropipeta Transferpettor 100µl, micropipeta VWR 10-100µl, micropipeta Finnpipette 20-200µl Termolabsystems.

Reactivos y otros

AccQ.Tag Eluyente A Waters, Kit reactive AccQ-Fluor Waters, Acetonitrilo FISHER, Ácido clorhídrico 37% Merck, Filtros PALL ACRODISC 0.45µm GHP, agua ultra-purificada obtenida mediante un sistema Ultra Purelab Enkrott.

Sustancias de referencia

Las sustancias de referencia fueron enviadas por el solicitante.

Tabla 3.2.P.5.3-1 Sustancias de referencia

Nombre	Lote	Contenido [%]^(a)	Fecha de vencimiento
Acetato de lisina	80702535	99.80	Mayo 2011
Tirosina	80501838	99.40	Marzo 2012
Histidina	80602251	99.40	Marzo 2010
Treonina	80501850	100.60	Enero 2014
Triptófano	80501789	100.10	Octubre 2010

^(a) contenido "como es"

Muestras

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-2 Identificación de las muestras

Código LEF	Identificación	Lote	Fecha vto.
Productos terminados			
PEI/2009/00190	Tabletas de Ketosteril	D24061/D24062	Julio 2011
Placebo			
ASS-PEI/2009/00190-01	Placebo con Ceto-ácidos e Hidroxiácidos	-	-

Tabla 3.2.P.5.3-3 Composición de producto terminado

Componente	Cantidad por tableta
Ceto e Hidroxi ácidos	
α-Ceto valina, sal de calcio	86.0 mg
α-Ceto isoleucina, sal de calcio	67.0 mg
α-Ceto leucina, sal de calcio	101.0 mg
α-Hidroximetionina, sal de calcio	59.0 mg
α-Ceto fenilalanina, sal de calcio	68.0 mg
Aminoácidos	
Acetato de Lisina	105.0 mg
Treonina	53.0 mg
Triptofano	23.0 mg
Histidina	38.0 mg
Tirosina	30.0 mg
Excipientes	
Excipientes	170.0 mg
Total	800.0 mg

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Condiciones analíticas

Columna: AccQ-Tag, 150 mm x 3.9 mm, 4µm
 Fase móvil A: 100 mL solución concentrada de AccQ-Tag eluyente
 A a 1000 mL con agua
 Fase móvil B: Acetonitrilo
 Fase móvil C: Agua
 Gradiente: ver tabla siguiente

Tabla 3.2.P.5.3-4 Condiciones de gradiente

Tiempo [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Curva
0	100	0	0	-
0.5	99	1	0	11
18	95	5	0	6
19	91	9	0	6
29.5	83	17	0	6
35	0	60	40	11
38	100	0	0	11
60	0	0	100	11
90	0	60	40	11
120	0	60	40	6
121	100	0	0	6
125	100	0	0	-
135	100	0	0	- *

* El tiempo de ejecución fue extendido a 135 min para garantizar la estabilización de la columna previo a una nueva inyección

Caudal: 1.0 mL/min
 Detección: Ultravioleta 248nm
 Volumen de inyección: 10 µl
 Temperatura de la columna: Temperatura ambiente
 Temperatura del inyector: 20°C
 Solvente: HCl 0.02 M

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Reactivo de derivatización: Kit reactivo AccQ-Fluor Waters consistente en AccQ-Fluor Borato buffer (recipiente 1), Polvo reactivo AccQ-Fluor (recipiente 2A) y Diluyente reactivo AccQ-Fluor (recipiente 2B).

Reconstitución de reactivos derivatizados: Pipetear 1.0 mL del recipiente 2B (luego de descartar el primer mL) en el recipiente 2A, que debe ser previamente tapado y agitado durante 10 seg. Finalmente calentar a 55°C con ocasional agitación hasta completa disolución del polvo. Este reactivo reconstituido tiene una vida útil de 1 semana y debe ser preservado en un desecador a temperatura ambiente. (El reactivo de derivatización será designado en lo sucesivo como Derivatizador I y AccQ-Fluor Borato buffer (recipiente 1) como Derivatizador II).

Tabla 3.2.P.5.3-5 Concentraciones de trabajo

Sustancia	C [µg/ mL]
Lysine acetate	21.0
Threonine	10.6
Tryptophan	4.6
Histidine	7.6
Tyrosine	6.0

Preparación de soluciones Selectividad

Solvente: HCl 0.02 M (diluir 1.67 mL de HCl 37% a 1000 mL con agua). Derivatizar el solvente - ver tabla "Reacción de derivatización". El solvente fue analizado previamente y luego de la filtración (Filtro GHP 0.45 µm).

Tabla 3.2.P.5.3-6 Soluciones individuales

Substance	Stock Solution			Intermediate Solution			Final Solution ^(b)	
	Sample drawn [mg]	V [mL] ^(a)	C [µg/ mL]	Aliquot [mL]	V [mL]	C [µg/mL]	Derivatization Rx	C [µg/mL]
Lysine acetate	52.61	50	1050	5	25	210		21.0
Threonine	26.34	50	530	5	25	106		10.6
Tryptophan	11.49	50	230	5	25	46		4.6
Histidine	19.12	50	380	5	25	76		7.6
Tyrosine	15.09	50	300	5	25	60		6.0

a) El solvente fue agregado y sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 5 min, el volumen fue completado con el mismo solvente.

b) La solución intermedia fue sometida a la reacción de derivatización.

Tabla 3.2.P.5.3-7 Solución de referencia

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Substance	Stock Solution			Intermediate Solution			Final Solution ^(b)	
	Sample drawn [mg]	V [mL] ^(a)	C [µg/mL]	Aliquot [mL]	V [mL]	C [µg/mL]	Derivatization Rx	C (µg/mL)
Lysine acetate	52.61	50	1050	5	25	210		21.0
Threonine	26.34		530			106		10.6
Tryptophan	11.49		230			46		4.6
Histidine	19.12		380			76		7.6
Tyrosine	15.09		300			60		6.0

- a) El solvente fue agregado y sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 5 min, el volumen fue completado con el mismo solvente
b) La solución intermedia fue sometida a la reacción de derivatización

Tabla 3.2.P.5.3-8 Solución muestra

Substance	Stock Solution			Intermediate Solution			Final Solution ^(d)	
	Sample drawn [mg] ^(a)	V [mL] ^(b,c)	C [µg/mL]	Aliquot [mL]	V [mL]	C [µg/mL]	Derivatization Rx	C [µg/mL]
Lysine acetate	≈800	100	1050	5	25	210		21.0
Threonine			530			106		10.6
Tryptophan			230			46		4.6
Histidine			380			76		7.6
Tyrosine			300			60		6.0

- a) Muestras de tabletas reducidas a polvo (≈800mg, equivalente a 1 tableta)
b) El solvente fue agregado y sometido a agitación magnética durante 60 min, luego sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 10 min, y finalmente el volumen fue completado con el mismo solvente
c) Filtración con filtro 0.45 µm GHP
d) La solución intermedia fue sometida a la reacción de derivatización

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-9 Solución placebo

Stock Solution			Intermediate Solution			Final Solution ^(d)	
Sample drawn [mg] ^(a)	V [mL] ^(b,c)	C [µg/mL]	Aliquot [mL]	V [mL] ^(d)	C [µg/mL]	Derivatization Rx	C [µg/mL]
≈551	100	-	5	25	-		-

- a) El placebo contiene los Ceto-ácidos, Hidroxiácidos y Excipientes (≈551mg, equivalente a 1 tableta).
b) El solvente fue agregado y sometido a agitación magnética durante 60 min, luego sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 10 min, y finalmente el volumen fue completado con el mismo solvente
c) Filtración con filtro 0.45 µm GHP
d) La solución intermedia fue sometida a la reacción de derivatización

Reacción de derivatización

En un tubo de vidrio, de aprox. 1 cm de diámetro y 10 cm de alto, introducir:

Tabla 3.2.P.5.3-10 Reacción de derivatización

Solution	Aliquot [µL] ^(a)	Derivatizing I [µL]	Derivatizing II [µL] ^(b)
Reference	40	280	80
Sample	40	280	80
Placebo	40	280	80

Derivatizador I – reactivo derivatizador reconstituido (recipiente 2A + recipiente 2B)
Derivatizador II – AccQ-Fluor Borato buffer (recipiente 1)

- a) Alícuota de soluciones intermedias respectivas
b) Luego de la adición del derivatizador II fue sometido a agitación durante 15seg, fue dejado en reposo por 1 minuto a temperatura ambiente e incubada a 55°C por 10 min

Linealidad

Tabla 3.2.P.5.3-11 Solución madre

Substance	Stock Solution		
	Sample drawn [mg]	V [mL] ^(a)	C [µg/mL]
Lysine acetate	105.22	100	1050
Threonine	52.68		530
Tryptophan	22.98		230
Histidine	38.23		380
Tyrosine	30.18		300

- a) El solvente fue agregado y sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 5min, el volumen fue completado con el mismo solvente

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Las siguientes soluciones fueron preparadas a partir de la solución madre:

Tabla 3.2.P.5.3-12 Preparación de soluciones

Solution ^(a)	Intermediate Solution		Final Solution ^(b)
	Aliquot [mL]	V [mL]	Derivatization Rx
50.0%	2.5	25	
80.0%	4	25	
100.0%	5	25	
120.0%	6	25	
150.0%	6	20	

a) Porcentaje en relación a la concentración de trabajo

b) La solución intermedia fue sometida a derivatización

Las concentraciones respectivas son:

Tabla 3.2.P.5.3-13 Concentración de soluciones

Substance	Solution ^(a)				
	50.0%	80.0%	100.0%	120.0%	150.0%
	C [µg/mL]				
Lysine acetate	10.50	16.80	21.00	25.20	31.50
Threonine	5.30	8.48	10.60	12.72	15.90
Tryptophan	2.30	3.68	4.60	5.52	6.90
Histidine	3.80	6.08	7.60	9.12	11.40
Tyrosine	3.00	4.80	6.00	7.20	9.00

(a) Porcentaje relacionado a la concentración de trabajo

Exactitud

Soluciones muestra

Soluciones placebo enriquecidas con acetato de lisina, treonina, triptófano, histidina y tirosina fueron preparados a 3 niveles de concentración, correspondientes a 80%, 100% y 120% de la concentración de trabajo, 3 réplicas de cada nivel, en un total de 9 determinaciones. Las soluciones fueron preparadas de acuerdo a la siguiente tabla:

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-14 Exactitud de soluciones madre

Level ^(a)	Substance	Stock Solution			
		Sample drawn [mg]	Placebo [mg] ^(b)	V [mL] ^(c,d)	C [µg/ mL]
80 %	Lysine acetate	84.17	≈551	100	840.0
	Threonine	42.15			424.0
	Tryptophan	18.39			184.1
	Histidine	30.59			304.1
	Tyrosine	24.15			240.1
100 %	Lysine acetate	52.61	≈361	50	1050.0
	Threonine	26.34			530.0
	Tryptophan	11.49			230.0
	Histidine	19.12			380.0
	Tyrosine	15.09			300.0
120 %	Lysine acetate	63.13	≈361	50	1260.0
	Threonine	31.61			636.0
	Tryptophan	13.79			276.0
	Histidine	22.94			456.0
	Tyrosine	18.11			360.0

- a) Porcentaje relacionado a la concentración de trabajo b) El placebo contiene los Ceto-ácidos, Hidroxiácidos y Excipientes c) El solvente fue agregado y sometido a agitación magnética durante 60smin, luego sometido a un baño ultrasónico a temperatura ambiente por aprox. 10 min, y finalmente el volumen fue completado con el mismo solvente
- d) Filtración con filtro 0.45 µm GHP

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Las siguientes soluciones fueron preparadas de las respectivas soluciones madre:

Tabla 3.2.P.5.3-15 Exactitud de soluciones muestra

Level ^(a)	Substance	Intermediate Solution			Final Solution ^(b)	
		Aliquot [mL]	V [mL]	C [µg/mL]	Derivatization Rx	C [µg/mL]
80 %	Lysine acetate	5	25	168.0	Derivatization Rx	16.80
	Threonine			84.8		8.48
	Tryptophan			36.8		3.68
	Histidine			60.8		6.08
	Tyrosine			48.0		4.80
100 %	Lysine acetate	5	25	210.0	Derivatization Rx	21.00
	Threonine			106.0		10.60
	Tryptophan			46.0		4.60
	Histidine			76.0		7.60
	Tyrosine			60.0		6.00
120 %	Lysine acetate	5	25	252.0	Derivatization Rx	25.20
	Threonine			127.2		12.72
	Tryptophan			55.2		5.52
	Histidine			91.2		9.12
	Tyrosine			72.0		7.20

a) Porcentaje en relación a la concentración de trabajo

b) La solución intermedia fue sometido a la reacción de derivaización

Solución de referencia

Una solución de las sustancias de referencia a la concentración de trabajo fue preparada como se describe en la Selectividad.

Precisión

Repetitividad del sistema

Una solución de las sustancias de referencia a la concentración de trabajo fue preparada como se describe en la Selectividad.

Repetitividad del análisis

Soluciones muestra

Se prepararon 6 réplicas de muestra a la concentración de trabajo como se describe en la Selectividad.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Solución de referencia

Una solución de las sustancias de referencia a la concentración de trabajo fue preparada como se describe en la Selectividad.

Precisión intermedia

2 operadores prepararon independientemente, en días diferentes, 6 réplicas de muestra y 1 solución de referencia, como se describe en Repetitividad del análisis.

Estabilidad de las soluciones

Solución muestra preparada como se describe en la Selectividad.

Solución de sustancias de referencia a la concentración de trabajo preparada como se describe en la Selectividad.

Estas soluciones fueron almacenadas a temperatura ambiente, protegidas de la luz durante 18 hs.

Adecuación cromatográfica del sistema

Solución de sustancias de referencia a la concentración de trabajo preparada como se describe en la Selectividad.

Resultados

Selectividad

La selectividad del método fue evaluada por el análisis de:

- Fase móvil
- Solvente filtrado y no filtrado
- Soluciones individuales de aminoácidos a la concentración de trabajo
- Solución de referencia a la concentración de trabajo
- Solución placebo a la concentración equivalente a la solución muestra
- Solución muestra a la concentración de trabajo

Criterio de aceptación

Los picos correspondientes a las sustancias de interés deben ser separados entre sí, esto es, los factores de resolución deben ser ≥ 1.5 .

Véase los resultados de la selectividad del método en la siguiente tabla:

Tabla 3.2.P.5.3-16 Selectividad

Solution	Identification	Rt [min]	RRt	RF
Mobile phase	-	-	-	-
Solvent (HCl 0.02M + Derivatization Reag.) non-filtered	- -	11.187 92.087	- -	- -
Solvent (HCl 0.02M + Derivatization Reag.) filtered	- -	11.742 92.601	- -	- -
Placebo	Solvent Solvent	11.026 92.071	- -	- -

Rt: Tiempo de retención RRt: tiempo de retención relativo de Triptofano
relación al pico de analito anterior

RF: factor de resolución en

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Histidine individual solution	Solvent	11.055	-	-
	Histidine	18.027	-	-
	Solvent	92.084	-	-
Threonine individual solution	Solvent	11.102	-	-
	Threonine	21.337	-	-
	Solvent	92.097	-	-
Tyrosine individual solution	Solvent	11.088	-	-
	Tyrosine	26.600	-	-
	Solvent	92.083	-	-
Lysine individual solution	Solvent	11.233	-	-
	Lysine	29.661	-	-
	Solvent	92.083	-	-
Tryptophan individual solution	Solvent	11.100	-	-
	Tryptophan	35.289	-	-
	Solvent	92.084	-	-
Reference solution	Solvent	11.072	0.32	-
	Histidine	18.020	0.51	-
	Threonine	21.227	0.60	14.05
	Tyrosine	26.589	0.76	32.91
	Lysine acetate	29.550	0.84	15.48
	Tryptophan	35.063	1.00	20.83
	Solvent	92.083	2.63	-
Sample solution (D24062 batch)	Solvent	11.147	0.31	-
	Histidine	18.312	0.51	-
	Threonine	21.305	0.59	13.38
	Tyrosine	26.731	0.74	33.15
	Lysine acetate	29.940	0.83	16.31
	Tryptophan	35.997	1.00	21.01
	Solvent	92.071	2.56	-

Rt: Tiempo de retención RRt: tiempo de retención relativo de Triptofano RF: factor de resolución en relación al pico de analito anterior

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Cromatogramas

Figura 3.2.P.5.3-1: Fase móvil

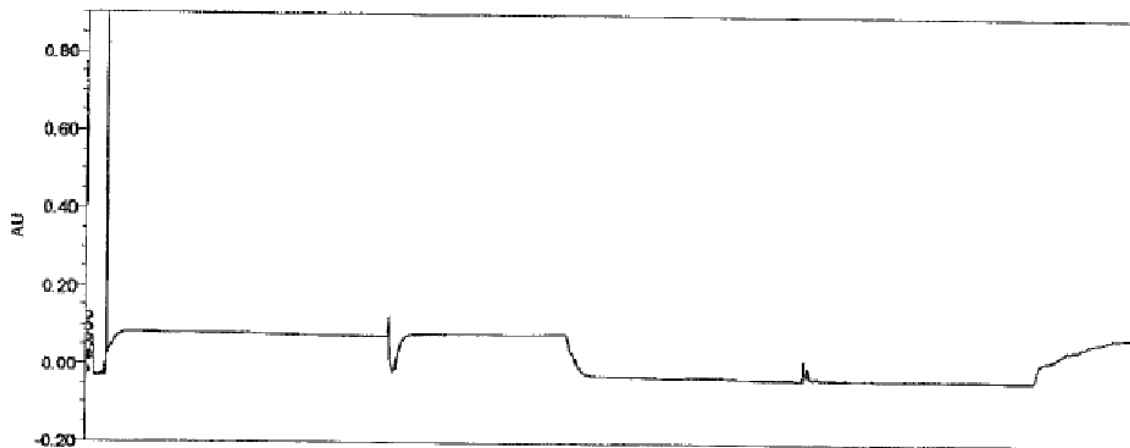


Figura 3.2.P.5.3-2: Solvente no filtrado

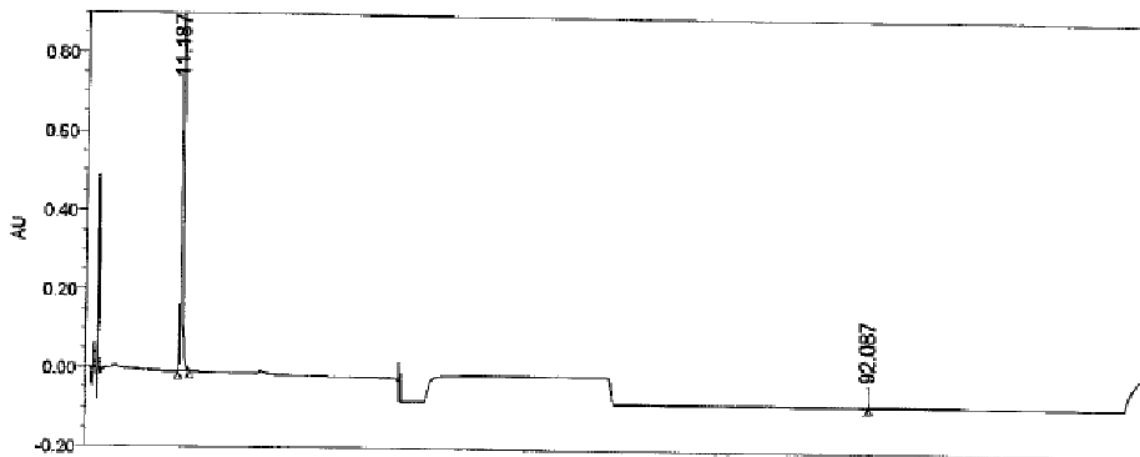
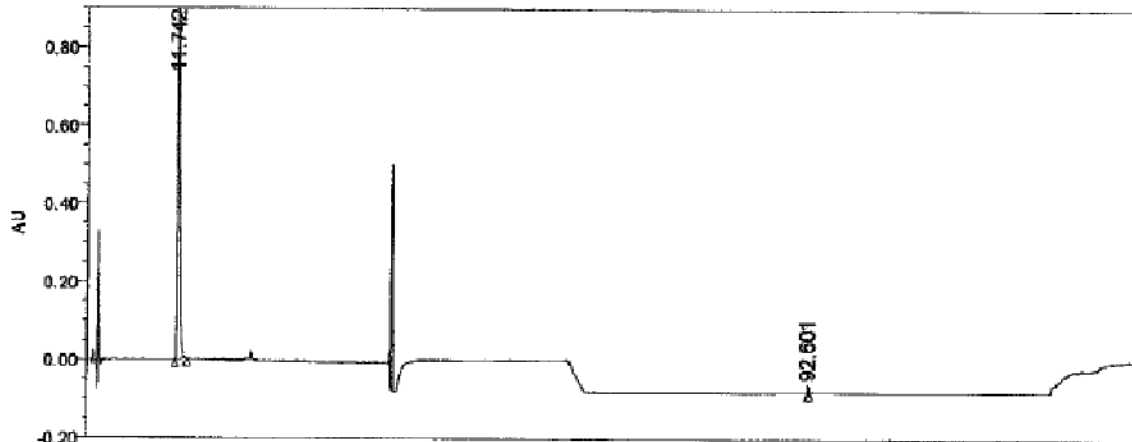


Figura 3.2.P.5.3-3: Solvente filtrado



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-4: Solución individual de referencia de Histidina a la concentración de trabajo

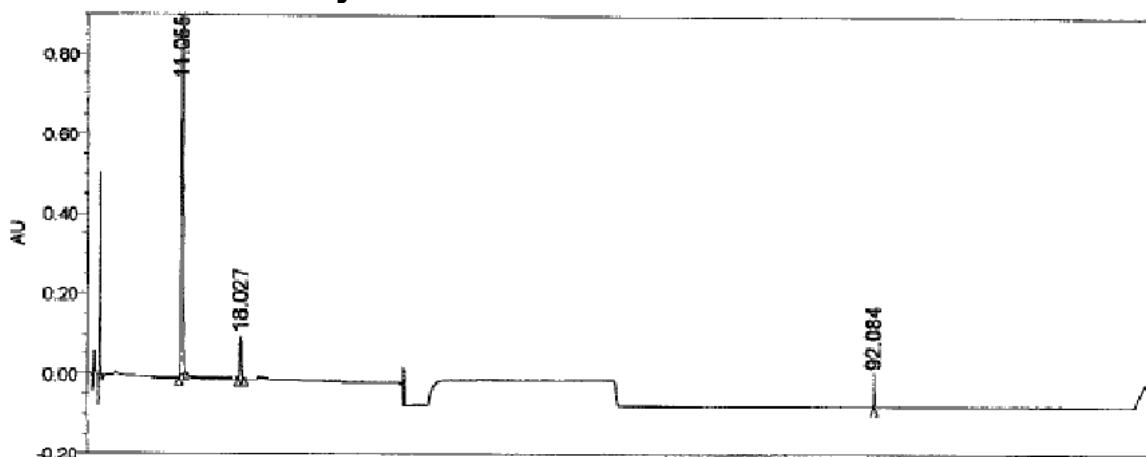


Figura 3.2.P.5.3-5: Solución individual de referencia de Treonina a la concentración de trabajo

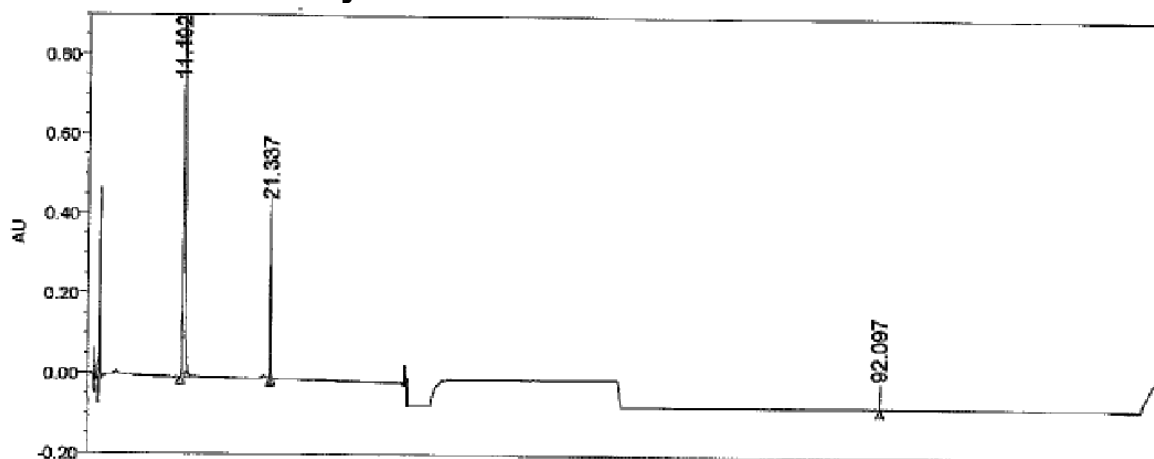
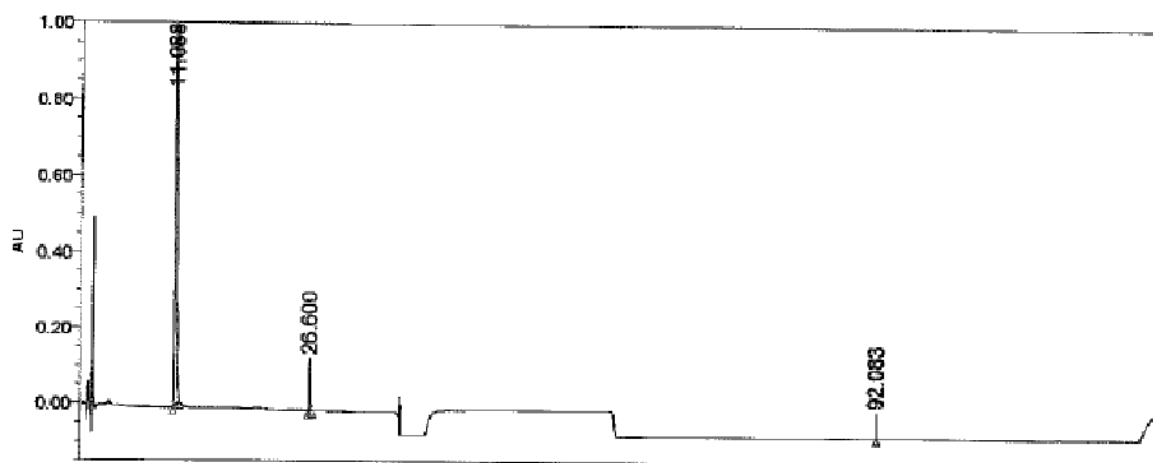


Figura 3.2.P.5.3-6: Solución individual de referencia de Tirosina a la concentración de trabajo



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-7: Solución individual de referencia de Lisina a la concentración de trabajo

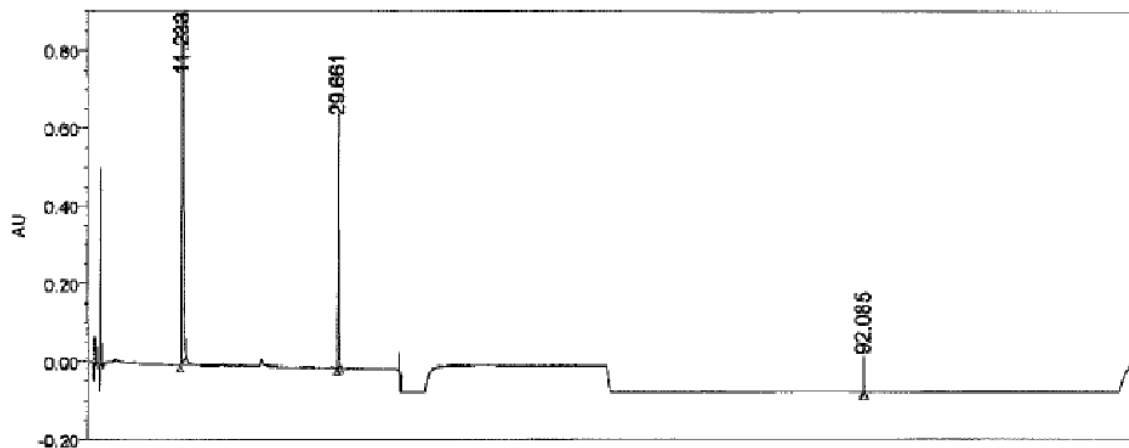


Figura 3.2.P.5.3-8: Solución individual de referencia de Triptofano a la concentración de trabajo

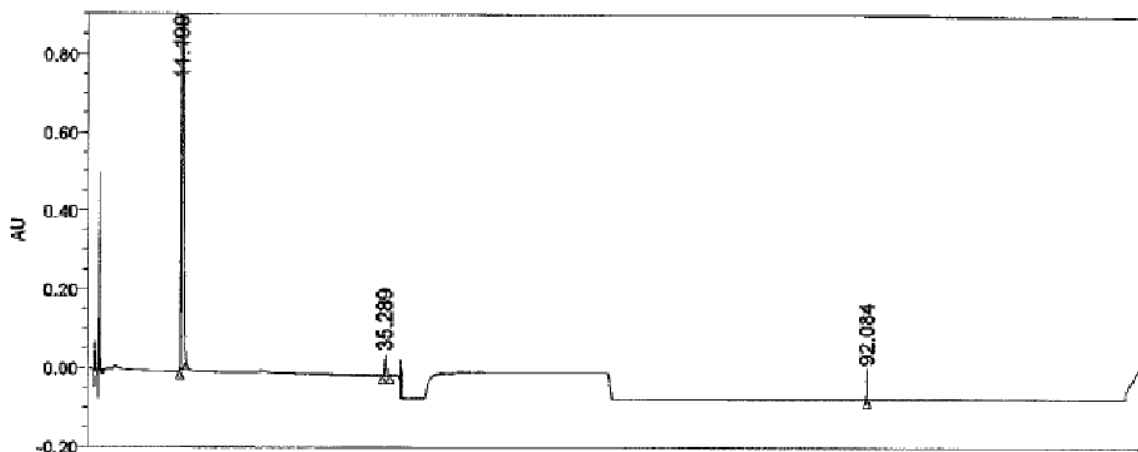
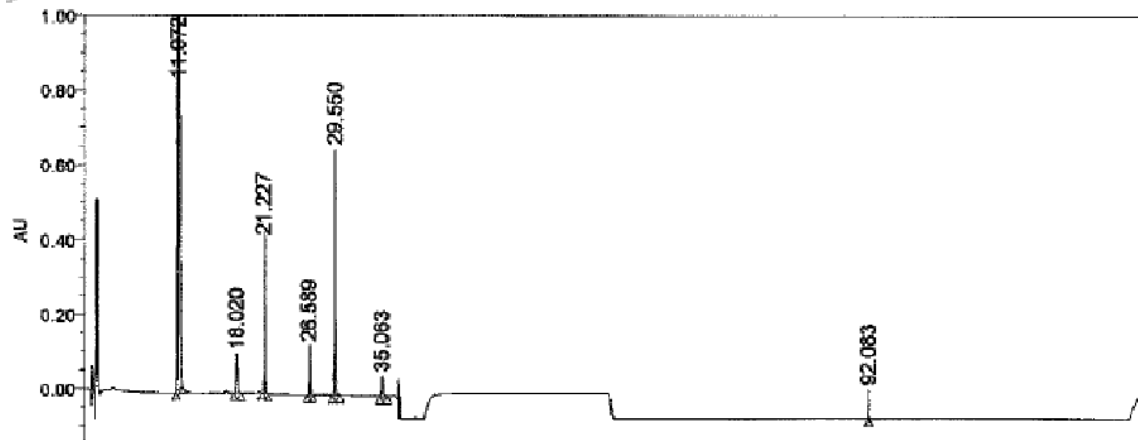


Figura 3.2.P.5.3-9: Solución de referencia a la concentración de trabajo



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-10: Placebo

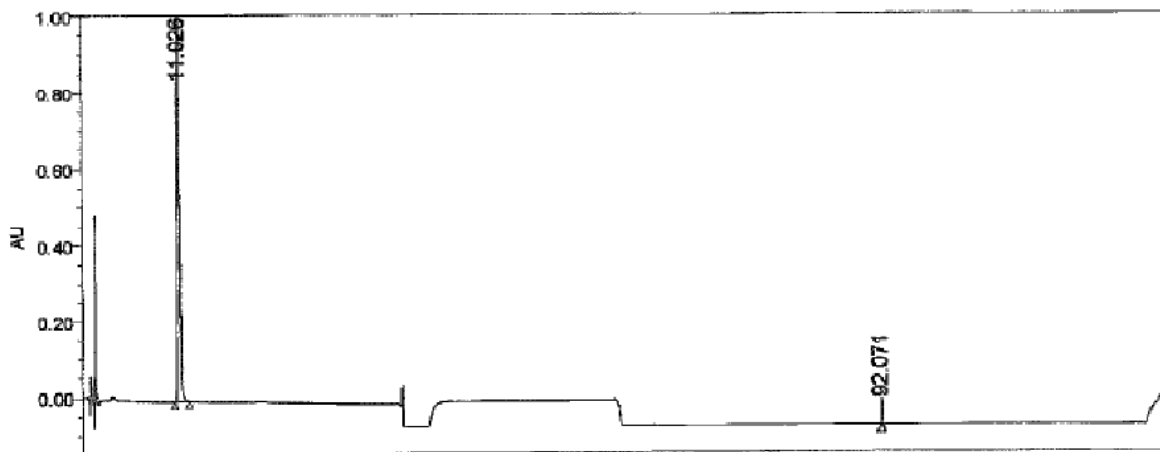
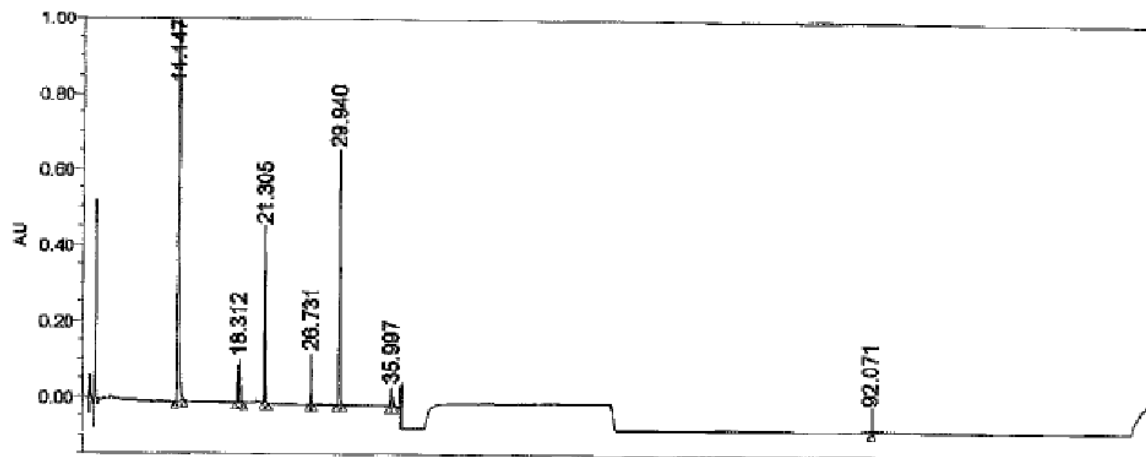


Figura 3.2.P.5.3-11: Solución muestra



Conclusión

Los resultados son acordes al criterio de aceptación, mostrando que el método analítico es selectivo para el ensayo de aminoácidos.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Linealidad

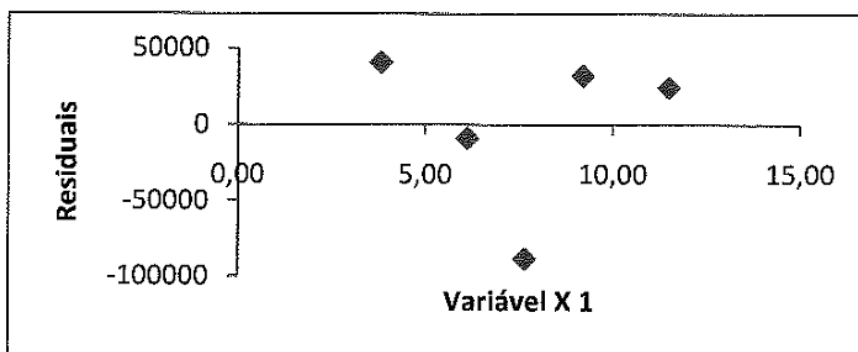
La linealidad del método fue evaluada con soluciones de referencia de acetato de lisina, treonina, triptófano, histidina y tirosina en un rango de concentración correspondiente a 50% a 150% de la concentración de trabajo, utilizando un mínimo de 5 soluciones estándar, 3 inyecciones por solución.

Utilizando el método de los mínimos cuadrados, la regresión lineal de los resultados analíticos fue calculada contra la concentración de las soluciones y se reportó el coeficiente de correlación (r^2), pendiente, intercepto, los respectivos límites con 95% de confianza y la representación gráfica de la regresión lineal. La distribución de los residuos también fue analizada.

Tabla 3.2.P.5.3-17 Parámetros de linealidad de Histidina

Parameters	Results	Acceptance Criteria
Linearity Range [$\mu\text{g/mL}$]	3.83; 6.13; 7.67; 9.20; 11.50	-
r^2	0.995731	≥ 0.99
Line equation		
Slope	210512.042	-
Intercept	-237004.418	-
95 % intercept limits	-442151.202/-31857.635	-

Figura 3.2.P.5.3-12: Representación gráfica de la distribución de residuos de Histidina

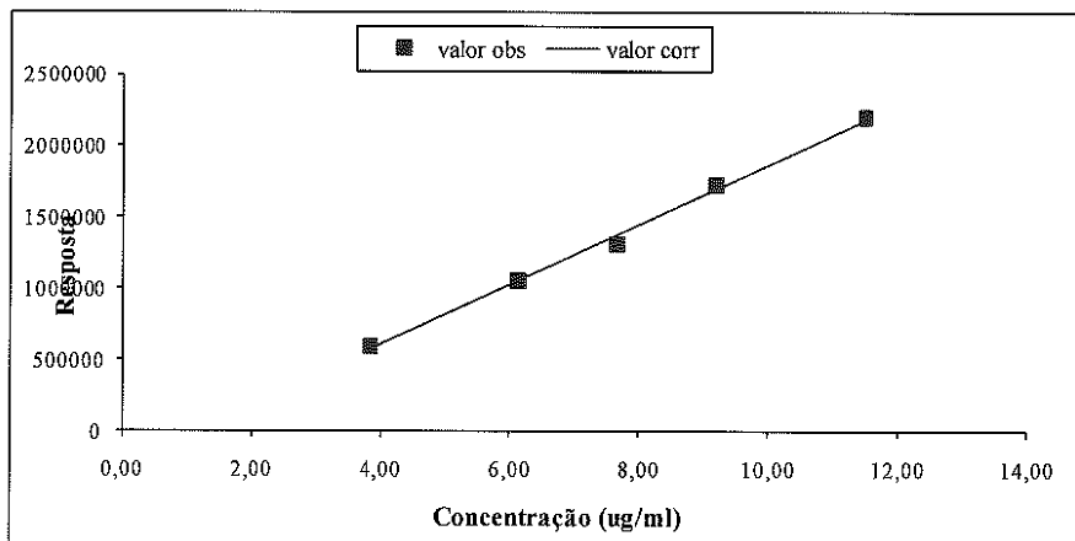


Residuais = Resíduos

Variável X1 = Variable X1

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-13 Representación gráfica de la regresión lineal de Histidina



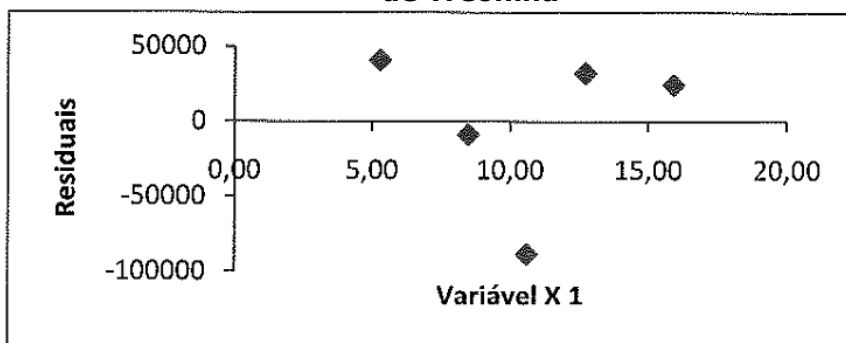
Respostas = Resultados
Concentração = Concentración

Tabla 3.2.P.5.3-18 Parámetros de linealidad de Treonina

Parámetros	Resultados	Criterio de aceptación
Linearity Range [µg/mL]	5.31; 8.49; 10.61; 12.73; 15.92	-
R ²	0.995330	≥0.99
Line equation		
Slope	275531.720	-
Intercept	-379634.037	-
95% intercept limits	-768375.982/9107.908	

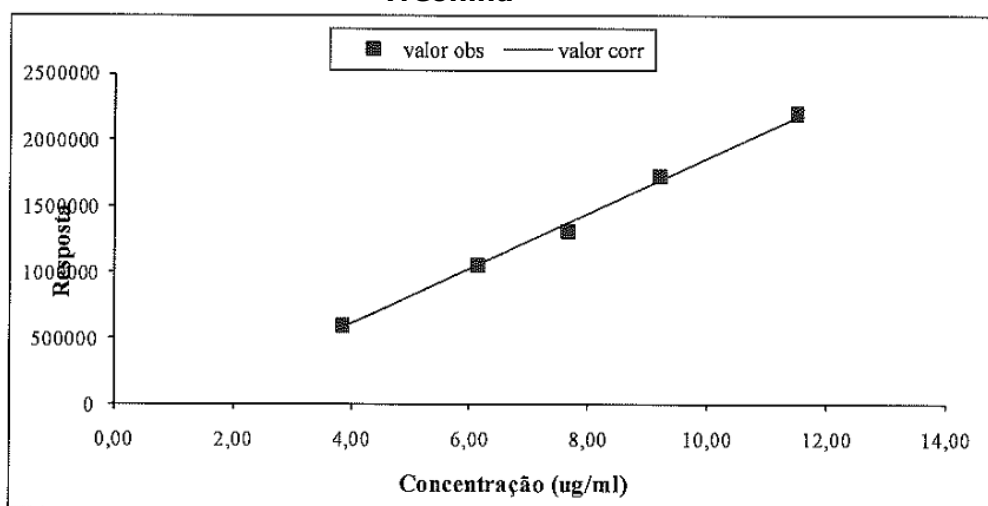
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-14 Representación gráfica de la distribución de residuos de Treonina



Residuais = Resíduos
Variável X1 = Variable X1

Figura 3.2.P.5.3-15 Representación gráfica de la regresión lineal de Treonina



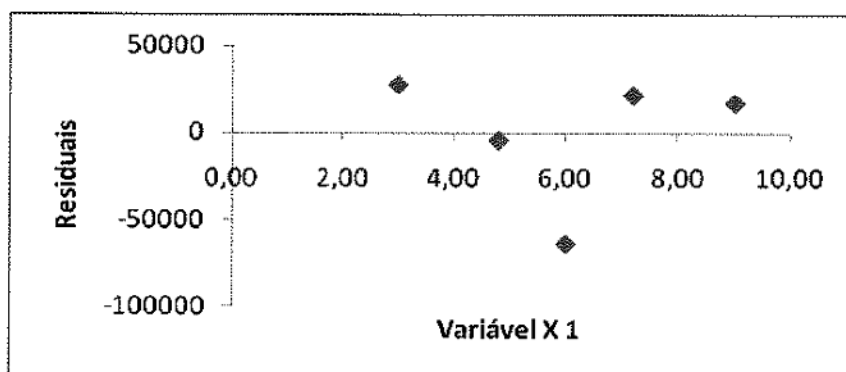
Respostas = Resultados
Concentração = Concentración

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-19 Parámetros de Linealidad de Tirosina

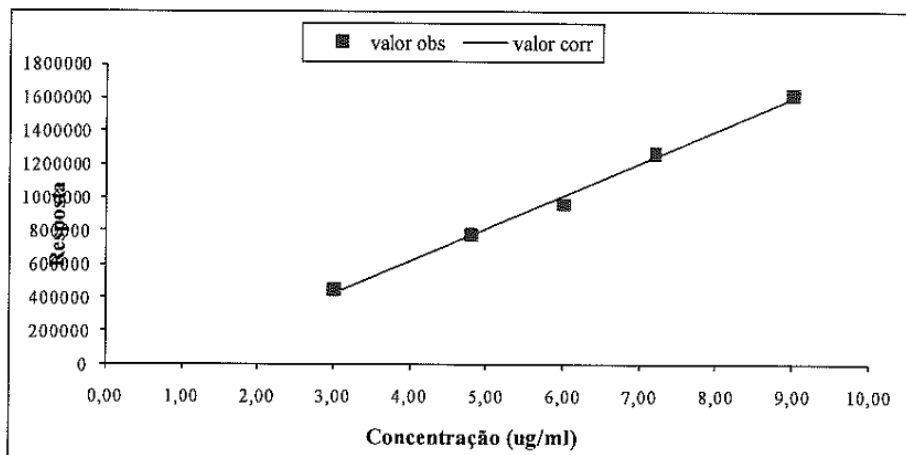
Parámetros	Resultados	Criterio de aceptación
Linearity Range [µg/mL]	3.00; 4.81; 6.01; 7.21; 9.01	-
R ²	0.995058	≥ 0.99
Line equation		
Slope	195549.229	-
Intercept	-162411.897	-
95 % intercept limits	-323161.298/-1662.495	

Figura 3.2.P.5.3-16 Representación gráfica de la distribución de residuos de Tirosina



Residuais = Residuos
Variável X1 = Variable X1

Figura 3.2.P.5.3-17 Representación gráfica de la regresión lineal de Tirosina



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

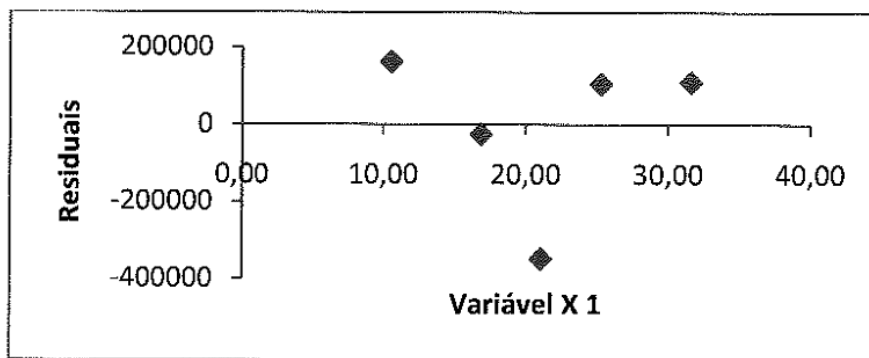
Respostas = Resultados

Concentração = Concentración

Tabla 3.2.P.5.3-20 Parámetro de linealidad de Lisina

Parámetros	Resultados	Criterio de aceptación
Linearity Range [$\mu\text{g}\{\text{ml}\}$]	10.54; 16.86; 21.08; 25.29; 31.61	-
R^2	0.994470	≥ 0.99
Line equation		
Slope	305938.817	-
Intercept	-875397.177	-
95 % intercept limits	-1808705.96/57911.605	

Figura 3.2.P.5.3-18 Representación gráfica de la distribución de residuos de Lisina

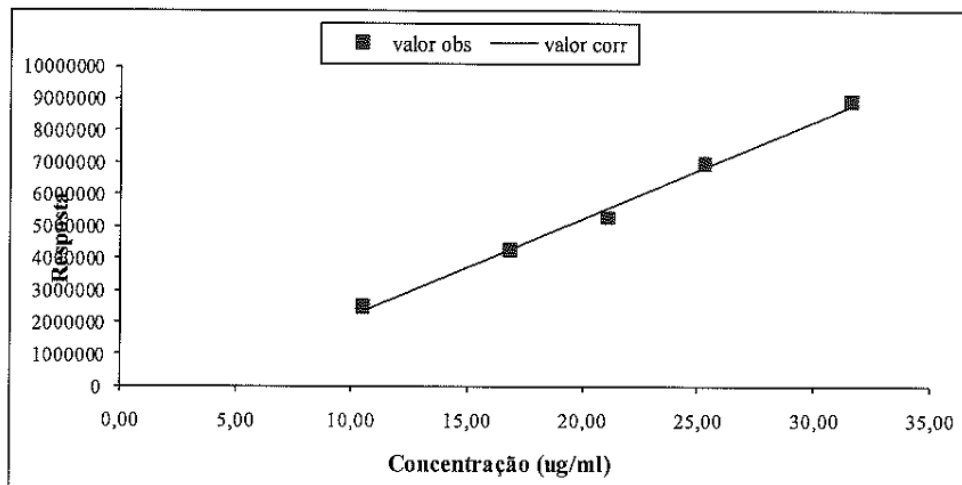


Residuais = Residuos

Variável X1 = Variable X1

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-19 Representación gráfica de la regresión lineal de Lisina



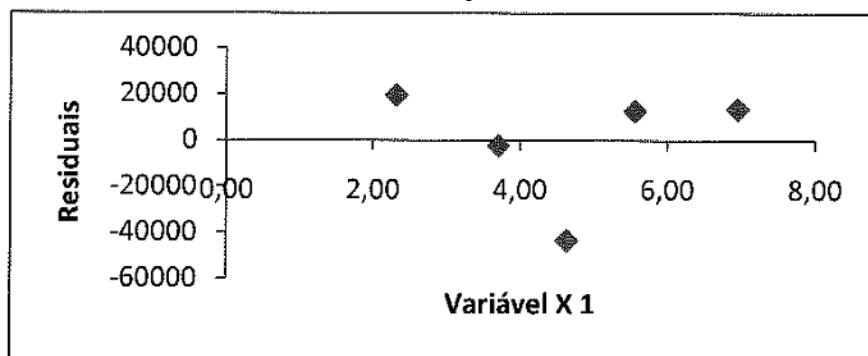
Respostas = Resultados
Concentração= Concentración

Tabla 3.2.P.5.3-21 Parámetros de linealidad de Triptófano

Parámetros	Resultados	Criterio de aceptación
Linearity Range [µg/mL]	2.32; 3.71; 4.63; 5.56; 6.95	-
R^2	0.997333	≥ 0.99
Line equation		
Slope	182915.307	-
Intercept	-132423.237	-
95 % intercept limits	-217521.823 / -47324.650	

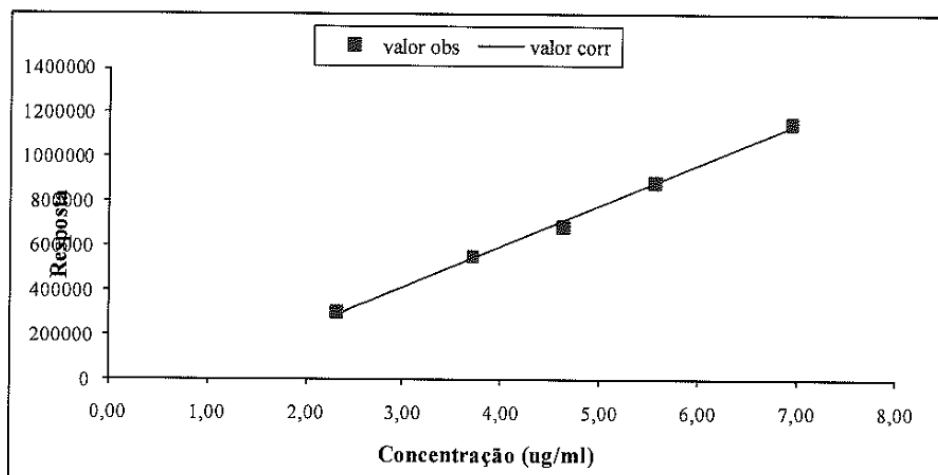
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-20 Representación gráfica de la distribución de residuos de Triptofano



Residuais = Residuos
Variável X1 = Variable X1

Figura 3.2.P.5.3-21 Representación gráfica de la regresión lineal de Triptófano



Respostas = Resultados
Concentração = Concentración

Conclusión

Los resultados obtenidos son acordes al criterio de aceptación establecido, mostrando que el método es lineal en el rango 50% a 150%.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Exactitud

La exactitud del método fue evaluada a través del análisis de placebo enriquecido con acetato de Lisina, Treonina, Triptofano, Histidina y Tirosina a 3 niveles de concentración, correspondiendo a 80%, 100% y 120% de la concentración de trabajo, 3 réplicas de cada nivel, en un total de 9 determinaciones, y fue expresado como porcentaje de recupero.

$$\% \text{ Recupero} = \text{Concentración calculada} / \text{Concentración nominal} \times 100$$

Para cada nivel de concentración, el % de recupero individual, el % de recupero promedio, así como el intervalo de 95% de confianza, fueron reportados. Los resultados pueden ser analizados en la siguiente tabla:

Tabla 3.2.P.5.3-22 Exactitud

Level	Concentration [µg/mL]		Recuperation [%]				Acceptance criteria*
	Nominal	Calculated	Individual	Average	CV [%]*	CI 95%	Individual R %
Histidine							
80 %	6.087	6.309	103.65	103.10	0.53	0.61	95.0-105.0
	5.976	6.160	103.09				
	5.966	6.119	102.57				
100 %	7.813	7.601	97.29	100.08	2.54	2.88	95.0-105.0
	7.634	7.807	102.27				
	7.785	7.838	100.69				
120 %	9.491	9.306	98.06	99.38	2.63	2.96	95.0-105.0
	9.280	9.066	97.69				
	9.137	9.356	102.39				
Threonine							
80 %	8.382	8.527	101.73	102.04	1.52	1.76	95.0-105.0
	8.456	8.771	103.72				
	8.561	8.618	100.66				
100 %	10.684	10.372	97.08	99.76	2.84	3.21	95.0-105.0
	10.792	11.087	102.73				
	10.792	10.736	99.47				
120 %	12.808	12.862	100.42	101.57	2.58	2.97	95.0-105.0
	12.925	12.889	99.72				
	12.708	13.289	104.57				
Tyrosine							
80 %	4.853	5.065	104.37	103.63	1.03	1.21	95.0-105.0
	4.926	5.129	104.12				
	4.853	4.970	102.41				
100 %	6.024	5.943	98.66	101.02	2.78	2.18	95.0-105.0
	6.059	6.309	104.12				
	6.079	6.095	100.26				
120 %	7.201	7.208	100.10	97.07	2.71	2.97	95.0-105.0
	7.288	6.950	95.37				
	7.411	7.097	95.76				

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-22 Exactitud (continuación)

Level	Concentration [µg/mL]		Recuperation [%]				Acceptance criteria*
	Nominal	Calculated	Individual	Average	CV [%]*	CI 95%	Individual R %
Lysine							
80 %	16.689 16.730 16.671	17.230 17.303 16.565	103.25 103.42 99.37	102.01	2.25	2.59	95.0-105.0
100 %	21.006 21.102 20.970	20.567 21.709 20.880	97.91 102.88 99.57	100.12	2.52	2.86	95.0-105.0
120 %	25.297 25.221 25.289	25.022 24.718 25.894	98.91 98.01 102.39	99.77	2.32	2.62	95.0-105.0
Tryptophan							
80 %	3.672 3.660 3.886	3.710 3.726 3.898	101.04 101.82 100.32	101.06	0.74	0.85	95.0-105.0
100 %	4.641 4.625 4.669	4.492 4.652 4.476	96.79 100.59 95.87	97.75	2.56	2.83	95.0-105.0
120 %	5.493 5.582 5.546	5.374 5.646 5.642	97.82 101.15 101.74	100.24	2.11	2.39	95.0-105.0

*Los criterios de aceptación fueron modificados a $CV \leq 3.0\%$ y % R individual: 95.0-105.0 debido al hecho de que la preparación implica una reacción de derivatización, los volúmenes de trabajo son muy pequeños - µl - y debido al hecho de que el solvente utilizado es muy volátil. Estos factores, al ser conjugados, introducen una contribución alta de error asociado con el volumen a los resultados finales.

Conclusión

Los resultados obtenidos están de acuerdo con el criterio de aceptación establecido, mostrando que el método es preciso en el rango de concentración evaluado.

Precisión

Repetitividad del sistema

La repetitividad del sistema fue evaluada a través del análisis de la variabilidad de la respuesta analítica, expresada por el coeficiente de variación (CV), de 6 inyecciones consecutivas de una solución estándar a la concentración de trabajo; ver resultados en la siguiente tabla.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-23 Repetitividad del sistema

Parameters	Results	Acceptance criteria*
Histidine		
Concentration [µg/ mL]	7.67	-
Mean Area, n=6	1306916.8	-
CV [%]	0.84	≤ 3.0
Mean Rt	18.31	-
CV [%]	0.33	-
Threonine		
Concentration [µg/ mL]	10.61	-
Mean Area, n=6	2419699.7	-
CV [%]	0.91	≤ 3.0
Mean Rt	21.34	-
CV [%]	0.07	-
Tyrosine		
Concentration [µg/ mL]	6.01	-
Mean Area, n=6	956972.3	-
CV [%]	0.82	≤ 3.0
Mean Rt	26.79	-
CV [%]	0.10	-
Lysine		
Concentration [µg/ mL]	21.08	-
Mean Area, n=6	5255068.2	-
CV [%]	0.94	≤ 3.0
Mean Rt	29.82	-
CV [%]	0.07	-
Tryptophan		
Concentration [µg/ mL]	4.63	-
Mean Area, n=6	685768.2	-
CV [%]	0.50	≤ 3.0
Mean Rt	35.49	-
CV [%]	0.16	-

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

*Los criterios de aceptación fueron modificados a $CV \leq 3.0 \%$ debido al hecho de que la preparación implica una reacción de derivatización, los volúmenes de trabajo son muy pequeños - μl - y debido al hecho de que el solvente utilizado es muy volátil. Estos factores, al ser conjugados, introducen una alta contribución de error asociado con el volumen a los resultados finales.

Análisis de repetitividad

La repetitividad de los análisis fue evaluada a través del estudio de variabilidad, expresada por el coeficiente de variación (CV), del ensayo de las réplicas de 6 muestras (lote D24062), preparadas a la concentración de trabajo; ver resultados en la siguiente tabla:

Tabla 3.2.P.5.3-24 Repetitividad del análisis

Parameters	Results	Acceptance criteria*
Histidine		
Content [% related to labelled content]	100.82 95.12 99.55 96.91 96.42 100.86	-
Average	98.28	-
CV [%]	2.5	≤ 3.0
Threonine		
Content [% related to labelled content]	102.00 95.18 100.86 98.73 97.77 103.28	-
Average	99.64	-
CV [%]	3.0	≤ 3.0
Tyrosine		
Content [% related to labelled content]	101.82 95.03 100.59 97.95 97.58 102.78	-
Average	99.29	-
CV [%]	3.0	≤ 3.0

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-24 Repetitividad del análisis (continuación)

Parameters	Results	Acceptance criteria*
Lysine		
Content [% related to labelled content]	101.68 95.09 100.48 98.21 98.66 103.82	-
Average	99.66	-
CV [%]	3.0	≤ 3.0
Tryptophan		
Content [% related to labelled content]	102.94 96.00 100.71 98.78 98.46 102.05	-
Average	99.82	-
CV [%]	2.6	≤ 3.0

*Los criterios de aceptación fueron modificados a $CV \leq 3.0\%$ debido al hecho de que la preparación implica una reacción de derivatización, los volúmenes de trabajo son muy pequeños - μl - y debido al hecho de que el solvente utilizado es muy volátil. Estos factores, al ser conjugados, introducen una alta contribución de error asociado con el volumen a los resultados finales.

Precisión intermedia

La precisión intermedia fue evaluada a través del estudio de los resultados del ensayo de variabilidad de la misma muestra (lote D24062), obtenidos por dos analistas, en días diferentes, de acuerdo al procedimiento utilizado para la repetitividad de los análisis.

La diferencia relativa (D%) entre 2 pruebas y la variabilidad de las dos pruebas, expresada mediante los coeficientes de variación combinados, fueron determinados por las siguientes expresiones:

$$D(\%) = |\text{Promedio de prueba 1} - \text{Promedio de prueba 2}|$$

$$CV_{\text{combinado}} (\%) = (S / \text{promedio de las 2 pruebas}) \times 100$$

S es la desviación estándar combinada de las dos pruebas, calculada por la siguiente expresión:

$$S^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)}$$

n_x = número de determinaciones de la prueba x

s_x^2 = diferencia de los datos de la prueba x

También fue evaluada la prueba-t de los resultados obtenidos. Ver resultados en la siguiente tabla.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-25 Precisión intermedia

Parameters	Results		Acceptance criteria*
	Test I	Test II	
Histidine			
Content [% related to labelled content]	100.82 95.12 99.55 96.91 96.42 100.86	100.80 97.32 96.44 95.57 98.26 98.72	-
Average	98.28	97.85	-
SD	2.45	1.85	-
CV [%]	2.5	1.9	≤ 3.0
Difference between tests [%]	0.43		≤ 3.0
Combined CV [%]	2.2		≤ 3.0
T Stat	0.48		-
Threonine			
Content [% related to labelled content]	102.00 95.18 100.86 98.73 97.77 103.28	100.57 98.88 96.68 95.76 99.19 99.68	-
Average	99.64	98.46	-
SD	2.98	1.85	-
CV [%]	3.0	1.9	≤ 3.0
Difference between tests [%]	1.18		≤ 3.0
Combined CV [%]	2.5		≤ 3.0
T Stat	0.92		-
Tyrosine			
Content [% related to labelled content]	101.82 95.03 100.59 97.95 97.58 102.78	100.51 98.24 96.75 95.06 97.92 97.19	-

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)**Tabla 3.2.P.5.3-25 Precisión intermedia (continuación)**

Parameters	Results		Acceptance criteria*
	Test I	Test II	
Average	99.29	97.61	-
SD	2.94	1.80	-
CV [%]	3.0	1.9	≤ 3.0
Difference between tests [%]	1.68		≤ 3.0
Combined CV [%]	2.5		≤ 3.0
T Stat	1.31		-
Lysine			
Content [% related to labelled content]	101.68 95.09 100.48 98.21 98.66 103.82	99.96 97.72 97.35 95.52 98.34 99.15	-
Average	99.66	98.01	-
SD	3.04	1.55	-
CV [%]	3.0	1.6	≤ 3.0
Difference between tests [%]	1.65		≤ 3.0
Combined CV [%]	2.4		≤ 3.0
T Stat	1.58		-
Tryptophan			
Content [% related to labelled content]	102.94 96.00 100.71 98.78 98.46 102.5	101.06 99.17 98.47 96.26 99.80 97.11	-
Average	99.82	98.65	-
SD	2.57	1.76	-
CV [%]	2.6	1.8	≤ 3.0
Difference between tests [%]	1.18		≤ 3.0
Combined CV [%]	2.2		≤ 3.0
T Stat	0.98		-

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

*Los criterios de aceptación fueron modificados a $CV \leq 3.0\%$ debido al hecho de que la preparación implica una reacción de derivatización, los volúmenes de trabajo son muy pequeños - μl - y debido al hecho de que el solvente utilizado es muy volátil. Estos factores, al ser conjugados, introducen una alta contribución al error asociado con el volumen a los resultados finales.

Conclusión

Los resultados obtenidos son acordes al criterio de aceptación establecido, mostrando que el método es preciso en el rango de concentración evaluado.

Estabilidad de las soluciones

La estabilidad del estándar y soluciones muestra, almacenadas a temperatura ambiente (20-24°C) y protegidas de la luz durante 18 hs, fue evaluada a través de la evaluación de variabilidad de la respuesta analítica, expresada por el coeficiente de variación (CV) de la inyección de la solución inmediatamente luego de la preparación y luego de un período definido.

Ver resultados en la siguiente tabla.

Tabla 3.2.P.5.3-26 Estabilidad de las soluciones durante 18 hs.

Substance	Areas (n=6)	CV [%]	Acceptance criteria*
Standard solution			
Histidine	t = 0 h 1172689 1189257	1.41	≤ 3.0
	t = 18 h 1200703 1212181		
Threonine	t = 0 h 2154320 2170684	0.77	
	t = 18 h 2182350 2193243		
Tyrosine	t = 0 h 869560 875537	0.57	
	t = 18 h 880843 879105		
Lysine	t = 0 h 4656328 4713749	0.96	
	t = 18 h 4741993 4759892		
Tryptophan	t = 0 h 613427 617488	0.27	
	t = 18h 616026 615631		

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-26 Estabilidad de las soluciones durante 18 hs. (continuación)

Substance	Areas (n=6)	CV [%]	Acceptance criteria*
Sample solution			
Histidine	t = 0 h 1174326 1195560	2.20	≤ 3.0
	t = 18h 1225181 1231056		
Threonine	t = 0 h 2253923 2287900	2.40	
	t = 18 h 2352213 2373586		
Tyrosine	t = 0 h 884352 899614	2.45	
	t = 18 h 930025 928147		
Lysine	t = 0 h 4895076 4942517	2.49	
	t = 18 h 5127425 5138106		
Tryptophan	t = 0 h 629053 643003	1.95	
	t = 18 h 642975 659733		

*Los criterios de aceptación fueron modificados a $CV \leq 3.0$ debido al hecho de que la preparación implica una reacción de derivatización, los volúmenes son muy pequeños - μl - y debido al hecho de que el solvente utilizado es muy volátil. Estos factores, al ser conjugados, introducen una alta contribución de error asociado con el volumen a los resultados finales.

Conclusión

Los resultados obtenidos muestran que la solución estándar y muestra son estables por 18 hs, cuando son almacenados a temperatura ambiente (20-24°C), protegidos de la luz.

Prueba de adecuación del sistema

Las pruebas de adecuación del sistema son establecidas para asegurar que el método y equipamiento presenten el desempeño esperado previo al análisis de las muestras de prueba.

La siguiente tabla muestra los resultados de la prueba de adecuación del sistema, determinados de acuerdo a Ph. Eur.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-27 Prueba de adecuación del sistema

Parameters ^(a)	Results	Recommended values
Theoretical plates number Histidine (≈ 18.3 min) Threonine(≈ 21.3 min) Tyrosine (≈ 26.8 min) Lysine (≈ 29.8 min) Tryptophan (≈ 35.5 min)	52082 386075 332387 363661 165133	≥ 2000 ^(b)
Symmetry factor Histidine (≈ 18.3 min) Threonine(≈ 21.3 min) Tyrosine (≈ 26.8 min) Lysine (≈ 29.8 min) Tryptophan (≈ 35.5 min)	1.03 1.12 1.08 1.10 1.06	$0.8 - 1.5$ ^(b)
Resolution factor Histidine (≈ 18.3 min) Threonine(≈ 21.3 min) Tyrosine (≈ 26.8 min) Lysine (≈ 29.8 min) Tryptophan (≈ 35.5 min)	- - 33.79 15.84 20.75	≥ 1.0 ^(d)
Injection repeatability, CV (%), n≥6 ^(c) Histidine (≈ 18.3 min) Threonine(≈ 21.3 min) Tyrosine (≈ 26.8 min) Lysine (≈ 29.8 min) Tryptophan (≈ 35.5 min)	0.84 0.91 0.82 0.70 0.50	≤ 2.0

(a) De acuerdo a Farmacopea Europea (b) Recomendaciones de Farmacopea Europea y CDER, (FDA), Validación de métodos cromatográficos (c) Datos recolectados en la repetitividad del sistema

(d) De acuerdo a las recomendaciones del cliente

Conclusión

Los resultados obtenidos muestran concordancia con los valores recomendados.

Conclusiones

La metodología analítica HPLC, con detección UV, para el ensayo de aminoácidos en el producto Ketosteril® tabletas recubiertas, fue validado.